

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C07K 7/64, A61K 38/13	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/01715
		(43) Date de publication internationale: 13 janvier 2000 (13.01.00)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/IB99/01232

(22) Date de dépôt international: 30 juin 1999 (30.06.99)

(30) Données relatives à la priorité:
1405/98 1er juillet 1998 (01.07.98) CH(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): DEBIO-
PHARM S.A. [CH/CH]; 17, rue des Terreaux, CH-1000
Lausanne 9 (CH).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): WENGER, Roland,
M. [CH/CH]; Grenzacherweg 45, CH-4125 Riehen (CH).
MUTTER, Manfred [DE/CH]; 9, chemin de la Venoge,
CH-1028 Préverenges (CH). RUCKLE, Thomas [DE/CH];
Université de Lausanne, Institut de Chimie Organique BCH
- DORIGNY, CH-1015 Lausanne (CH).(74) Mandataire: CURRAT, Vanessa; Debiopharm S.A., 17, rue
des Terreaux, CH-1000 Lausanne 9 (CH).(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY,
CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet
ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW),
brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: NOVEL CYCLOSPORIN WITH IMPROVED ACTIVITY PROFILE

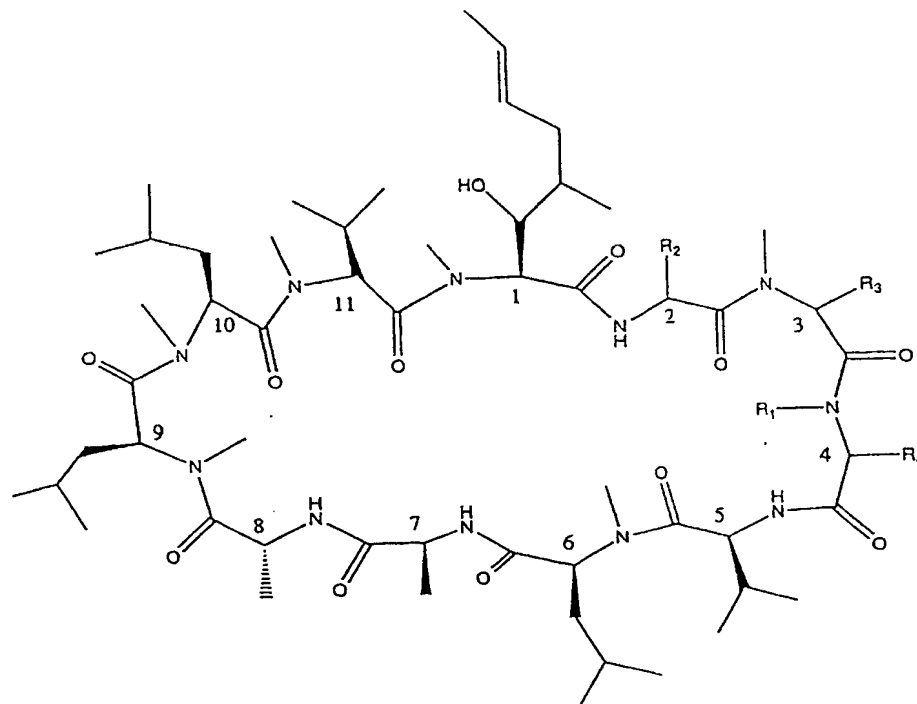
(54) Titre: NOUVELLE CYCLOSPORINE AYANT UN PROFIL D'ACTIVITE AMELIORE

(57) Abstract

The invention concerns a novel cyclosporin, its pharmaceutical use and a pharmaceutical composition containing it.

(57) Abrégé

La présente invention traite d'une nouvelle cyclosporine, de son utilisation pharmaceutique ainsi que d'une composition pharmaceutique la comprenant.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Nouvelle cyclosporine ayant un profil d'activité amélioré

5

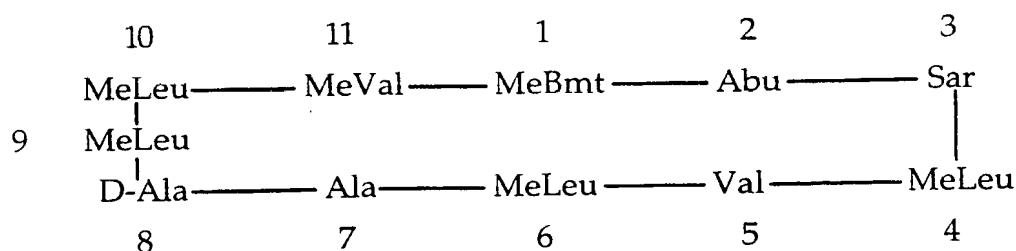
La présente invention traite d'une nouvelle cyclosporine (Cs) de son utilisation pharmaceutique ainsi que d'une composition pharmaceutique la comprenant.

10

Les Cs sont une classe de undécapeptides cycliques, poly-N-méthylés, possédant plusieurs activités pharmacologiques, en particulier ce sont des agents immunosuppresseurs, anti-inflammatoires, anti-parasitiques, suppresseurs de résistance aux
15 drogues (anti-MDR) et anti-virales. La première cyclosporine isolée à partir d'une culture de champignon est la cyclosporine A, que l'on trouve à l'état naturel et qui est représentée par la formule suivante:

20

Structure de la cyclosporine A



25

Abu	= acide L- α -Aminobutyrique
Ala	= L-Alanine
MeBmt	= N-Méthyle-(4R)-4-[(E)-2-butényl]-4-méthyle-L-thréonine
Leu	= L-Leucine

COPIE DE CONFIRMATION

	MeLeu	= N-Méthyle-L-leucine
	MeVal	= N-Méthyle-L-valine
	Nva	= L-Norvaline
	Sar	= Sarcosine
5	Thr	= L-Thréonine
	Val	= L-Valine

Les acides aminés décrits suivant leur abréviation conventionnelle sont de configuration L à moins qu'il en soit
10 spécifié autrement.

Depuis que cette première cyclosporine a été découverte un grand nombre d'autres variétés ont été isolées et identifiées de même que des variétés non naturelles obtenues par des méthodes
15 synthétiques ou semi-synthétiques, ou même par l'application de techniques de culture modifiées. La production de la cyclosporine A est décrite par [Kobel et al. European Journal of applied Microbiology and biotechnology 14,237-240 (1982)]. On décrit aussi la fabrication de cyclosporines artificielles produites par méthode
20 purement synthétique développée par R. Wenger - voir Traber et al. 1, Traber et al. 2 et Kobel et al., US 4,108,985; 4,210,581; 4,220,641; 4,288,431; 4,554,351 et 4,396,542; EP 34 567 et 54 782; WO 86/02080; Wenger 1, Transpl. Proc.15, Suppl. 1:2230 (1983); Wenger 2, Angew. chem. Int. Ed., 24,77 (1985); et Wenger 3, Progress in the
25 chemistry of organic Natural Products 50, 123 (1986).

La cyclosporine A (CsA), isolée il y a 20 ans à partir du *Tolypocladium inflatum* possède une forte activité immunosuppressive. Elle a révolutionné la transplantation
30 d'organes et est couramment utilisée dans le traitement de maladies auto-immunes. Pour une vision récente de l'utilisation de la CsA et ses mécanismes d'action voir Wenger et al: Cyclosporine Chemistry, Structure-activity relationships and

Mode of action, Progress in Clinical Biochemistry and Medecine,
Vol. 2, 176 (1986).

L'effet thérapeutique de la CsA résulte principalement en la
suppression sélective de l'activation des lymphocytes T. Cette
activité immunosuppressive s'explique par le fait que la CsA se
lie à un récepteur protéique intracellulaire, la cyclophiline A
(CyP) formant un complexe CyP-CsA qui va interagir avec la
calcineurine (CaN) et inhiber ainsi son activité phosphatase.
Ainsi la transcription de familles de gènes à activation précoce
sera bloquée (cf: O'Keefe, S.J; Tamura, J; *Nature* 1992, 357, 692-694).

Le sujet de la présente invention est la production d'une
nouvelle cyclosporine à forte activité inhibitrice du HIV-1 (virus
de l'immunodéficience humaine), n'ayant pas l'activité
immunosuppressive de la CsA.

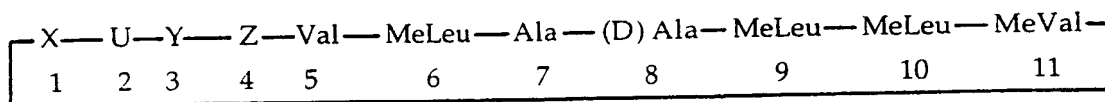
La mode d'infection de HIV de type 1 est unique parmi les
rétrovirus car il nécessite l'incorporation spécifique dans son
virion de la protéine cellulaire CyP qui va interagir avec la
polyprotéine Gag (cf: Eltaly Kara Franke, Bi-Xing Chen *Journal of*
virology, sept. 1995. Vol 69, N°9). Il est connu que la CyP se lie à la
CsA et la CaN en un complexe ternaire. Cependant la fonction
native de la CyP est de catalyser l'isomérisation des liaisons
peptidyl-prolyl, une étape limitante et importante dans le
processus permettant aux protéines d'acquérir une structure
tridimensionnelle définitive. La CyP protège également les
cellules contre les chocs thermiques ou sert de protéine
chaperonne. Au contraire de la CsA, le produit du gène Gag du
HIV-1 interdit la formation d'un complexe ternaire avec la CyP et
la CaN. En fait, le virus HIV a besoin de la Cyp pour se lier avec le
produit du gène Gag de manière à constituer ses propres virions
(Cf: Franke, E.K; 1994 *Nature* 372:359-362). En présence de CsA il y a

compétition directe avec la polyprotéine issue du gène Gag de HIV-1 pour se lier à la CyP. Cette CsA va agir à deux niveaux sur la réplication du cycle viral. Tout d'abord au niveau de la translocation vers le noyau du complexe préintégré puis dans la
5 production de particules virales infectieuses.

Le brevet US 4,814,323 décrit déjà une activité anti-HIV de la CsA, cependant celle-ci présente aussi une forte activité immunosuppressive qui n'est pas souhaitée pour le traitement
10 des patients infectés par le virus HIV. Récemment un autre type de cyclosporine a été développé, il s'agit de dérivés en position 4 tels que Melle⁴ Cs, MeVal⁴ Cs, ou (4-OH) MeLeu⁴-Cs pour ne citer que les substances les plus anti-HIV et les moins immunosuppressives. Le dérivé [(4-OH) MeLeu⁴-Cs] est
15 synthétisé par oxydation de la cycloporine A à l'aide d'un microorganisme. Un autre brevet WO 97/04005 emploie la méthode de préparation du brevet EP 484 281 ainsi que et la méthode développée par Seebach EP 194972 afin de produire des dérivés en position 3, tel que par exemple la (D)-MeSer³-(4-
20 OH)MeLeu⁴-cyclosporine. Cette substance possède une meilleures affinité à la CyP, mais ne possède plus qu'une activité anti-HIV limitée par rapport au dérivé de référence Melle⁴-CS (NIM 811). Le caractère plus hydrophile de cette substance empêche sa pénétration dans les cellules et dans l'organisme. Ceci se reflète
25 directement sur l'activité anti-HIV réduite de cette substance (cf. Christos Papageorgiou, J.J. Sanglier et René Traber - *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol 6, N°1, pp 23-26, 1996).

Les substances décrites dans cette invention présentent le double
30 avantage de conserver la même affinité à la Cyp que celle observée pour la [(4 - OH) Meleu⁴]-Cs ou la cyclosporine A tout en ayant une activité anti-HIV identique voire supérieure à celle des dérivés de références (MeVal⁴-Cs ou Melle⁴-Cs) et nettement

supérieure à l'activité anti-HIV de la cyclosporine A ou de la (4 - OH) MeLeu⁴-CS. Le sujet de l'invention est de fournir une nouvelle cyclosporine, n'ayant pas l'activité immunosuppressive de la CsA et possédant un profil d'activité amélioré. Cette
 5 nouvelle famille de Cs est caractérisée par la formule (I):



(I)

10 dans laquelle:

X est -MeBmt ou 6,7 dihydro-MeBmt-

U est -Abu, Nva, Val, Thr

Y est Sar ou (D)-MeSer ou (D)-MeAla ou (D)-MeSer (OAcyl)

Z est (N-R)aa où aa={ Val, Ile, Thr, Phe, Tyr, Thr (OAc), Thr (OG₁),
 15 Phe (G₂), PheCH₂(G₃), Tyr (OG₃) } avec R={ alkyl > CH₃ };
 G₁= { Phényle-COOH, Phényle-COOMe, Phényle-COOEt };
 G₂= { CH₂COOH, CH₂COOMe(Et) } ; CH₂PO(OMe)₂, CH₂PO(OH)₂ }
 G₃= { PO(OH)₂, PO(OCH₂CH=CH₂)₂, CH₂COOH, CH₂COOMe (Et) }

20 Ainsi en remplaçant le groupement MeLeu naturel en position 4 par un groupement N-(alkyl) aa (où alkyl > CH₃), on améliore l'activité anti-HIV 1 de ce ce dérivé.

La nouvelle molécule de cyclosporine ainsi obtenue offre
 25 l'avantage inattendu et surprenant de présenter une bien meilleure stabilité à la métabolisation que toutes les autres cyclosporines connues jusqu'à présent.

Cette nouvelle molécule résiste beaucoup mieux aux
 30 phénomènes d'oxydation et de dégradation qui ont lieu dans la

cellule. De ce fait, la durée de vie "in vivo" de cette nouvelle N-alkyl aa Cs se trouve particulièrement prolongée.

De plus, cette nouvelle N-alkyl aa⁴ cyclosporine possède une
5 affinité élevée pour la CyP et présente une activité anti-HIV égale ou supérieure aux meilleures cyclosporines existantes.

La figure 1 représente la structure générale de cette nouvelle cyclosporine. Les groupements R1, R2, R3 et R4 seront largement
10 décrits à la Table III. Ainsi en transformant ces 4 positions clés il a été possible de conserver une très bonne affinité à la cyclophiline, et d'empêcher la formation d'un complexe ternaire avec la CaN et surtout d'augmenter de manière particulièrement avantageuse sa stabilité à l'oxydation enzymatique et par conséquent son activité
15 anti-HIV .

Cette nouvelle cyclosporine est donc principalement caractérisée par la présence en position 4 d'un résidu avec $R > CH_3$ et
 $R < -C_{10}H_{21}$. On utilisera comme substituant de l'azote par
20 exemple l'éthyle, le propyle, le butyle ou le pentyle, mais ces exemples ne sont pas limitatifs. Cette nouvelle cyclosporine est particulièrement active lorsque le résidu en position 4 est un acide aminé N-éthylé (voir dessins 2 et 3).

25 L'invention revendique également la composition pharmaceutique de la substance telle que décrite par la formule (I). Celle-ci peut-être associée à une solution acceptable d'un point de vue pharmaceutique. La formule galénique ainsi produite permet d'augmenter la solubilité dans l'eau ou de maintenir la
30 composition sous forme de microémulsions en suspension dans l'eau. Le but de cette invention est également de fournir un nouveau médicament qui peut être utilisé par exemple dans le traitement et la prévention du SIDA (syndrome

d'immunodéficience acquise). On utilisera tout particulièrement la cyclosporine modifiée en position 4 par un résidu Z étant N-éthyle-Valine pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement et à la prévention du SIDA. L'application pour la
5 prévention du SIDA n'est pas limitative. Cette substance peut aussi être employée par exemple pour ses propriétés anti-inflammatoires.

En ce qui concerne le procédé de fabrication de cette nouvelle
10 cyclosporine nous avons utilisé les techniques classiques décrites dans la littérature ainsi que certaines méthodes spécifiques développées en laboratoire.

Le procédé de synthèse de la CsA est décrit dans : R.Wenger
15 (Helv. Chim. Acta Vol 67 p. 502-525 (1984)). Le procédé d'ouverture de la cyclosporine A protégée (OAc) est décrit dans Peptides 1996. La molécule de CsA est traitée par le réactif de Meerwein $(CH_3)_3OBF_4$ puis scindée par traitement à l'acide dans le méthanol ou hydrolysée par l'eau, afin de la transformer en un
20 peptide linéaire de 11 résidus d'acides aminés: H-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-(D)Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OCH₃. Ce procédé a été présenté à la conférence internationale de la société européenne des Peptides (EPS-24) à Edimbourg 8-13
septembre 1996 et publié dans PEPTIDES 1996 par R.Wenger . Ce
25 peptide linéaire est ensuite traité selon le procédé classique de Edman afin de scinder son dernier résidu d'acide aminé (MeLeu) et de fournir notre produit de départ: le décapeptide H-Val-MeLeu-Ala-(D)Ala-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe. Ce produit est ensuite utilisé dans les étapes suivantes:

Préparation de (1) (protection):

**Boc-Val-MeLeu-Ala-(D)Ala-MeLeu-MeLeu-MeValMeBmt(OAc)
-Abu-Sar-OMe (1)**

- 5 A une solution de 2.83 g (2.46 mmoles) du décapeptide H-Val-MeLeu-Ala-(D)Ala-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-Ome dans 120 ml de dioxane sont ajoutés 0,72 ml (4.18 mmoles) d'une solution de diisopropyléthylamine et 0.65 g (2.95 mmoles) de Boc anhydride dans 50 ml de dioxane. On rajoute 17 ml d'eau à la
- 10 solution qui est mélangée pendant 2 heures à température ambiante. Le solvant est alors évaporé et le mélange réactif résultant est dissous dans 300 ml d'acétate d'éthyle puis lavé 3 x avec une solution à 5 % d'acide citrique, 3 x avec une solution saturée en NaHCO₃ et enfin 3 x avec une solution en NaCl. Les
- 15 phases organiques sont séchées au moyen de Na₂ SO₄ anhydre, filtrées et le solvant est finalement évaporé sous vide. On obtient ainsi 3 g (98%) du décapeptide protégé (Boc-décapeptide-méthyle ester).
- 20 Le produit est ensuite utilisé pour les voies de synthèse suivantes sans étape de purification supplémentaire. Cette substance est hydrolysée puis activée et condensée avec 1 acide aminé correspondant afin de produire un nouveau peptide à 11 résidus, produit de départ pour la cyclisation et la production d'une
- 25 nouvelle cyclosporine aux propriétés désirées.

Préparation de (2) (Hydrolyse de l'ester):

**Boc-Val-MeLeu-Ala-(D)Ala-MeLeu-MeLeu-MeValMeBmt(OAc)
30 -Abu-Sar-OH (2)**

A 4.08 g (3.26 mmoles) du composé précédent (I) dans 146 ml de tétrahydrofurane sont rajoutés goutte-à-goutte (à 15 °C) 192 mg

(4.56 mmoles) de LiOH/H₂O dissous dans 36 ml d'eau. On agite le tout à 15 °C. La réaction est complète au bout de 120 heures après l'addition successive de 5 portions respectivement de 1.4 équivalents de LiOH/H₂O chacune. La solution obtenue est
5 neutralisée par 0.1 N HCl et le solvant est ensuite évaporé. Le produit solide récupéré est alors dissout dans 500 ml d'acétate d'éthyle et lavé 2 x avec une solution à 5 % d'acide citrique et 2 x avec une solution de saumure. Les phases aqueuses sont extraites 4 x par l'intermédiaire de 50 ml d'acétate d'éthyle et les phases
10 organiques regroupées sont alors séchées avec du Na₂SO₄ anhydre, filtrées et évaporées. On obtient ainsi 3.84 g (95 %) du composé (2). Le produit est alors utilisé sans purifications supplémentaires.

15 Préparation de (3) (addition d'un nouvel acide aminé):
**Boc-Val-MeLeu-Ala-(D)Ala-Meleu-Meleu-MeVal-MeBmt(OAc)-
Abu-Sar-EtVal-OtBu (3)**

6.18 g (5 mmoles) du composé (2) sont dissous dans 250 ml de
20 dichlorométhane anhydre sous argon. La solution est alors refroidie et on ajoute lentement sous argon 3.9 ml de N-méthylmorpholine (10 mmoles; pH 8.5) et 1.1 ml (10 mmoles) d'isobutylchloroformiate. La solution est agitée durant 15 minutes à -15 °C. On ajoute alors pendant 20 minutes une solution de 2.4 g
25 (12 mmoles) de H-NEt Val-OtBu dissous dans 40 ml de dichlorométhane anhydre. Le mélange est alors agité 1 heure à -15°C, puis 1 heures à 0° C et enfin toute la nuit à température ambiante. Par la suite, on rajoute 400 ml de dichlorométhane puis on opère à 3 extractions par une solution d'acide citrique à 5 %
30 suivie de 3 extractions par une solution saturée en NaHCO₃ et enfin 3 dernières extractions avec une solution saturée en NaCl. Les phases organiques sont séchées avec du Na₂SO₄ anhydre puis

filtrées et finalement le solvant est évaporé. On récupère après chromatographie 4.42 g (62 %) de undécapeptide pur.

5 Préparation de (4) (déprotection):

**H-Val-MeLeu-Ala-(D)-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-
Abu-Sar-EtVal-OH (4)**

830 mg (0.58 mmole) de undécapeptide protégé (4) sont dissous
10 dans 15 ml de dichlorométhane pur. A cette solution on ajoute
pendant 3 min. à température ambiante 3.2 ml d'acide
trifluoroacétique. La réaction est suivie par une HPLC qui s'avère
complète au bout de 1 h 30. Le solvant est évaporé et le restant de
l'acide trifluoroacétique est évaporé 2 x en présence d'acétate
15 d'éthyle.

Le produit brut (900 mg) est purifié par chromatographie [150 g de
gel de silice (0.4-0.63)], utilisation comme éluants de
dichlorométhane/méthanol/ triéthylamine (17:3:0.05) pour
20 éluer 700 mg (95 %) de undécapeptide déprotégé (4) pur.

Préparation de (5) (cyclisation):

MeBmt(OAc)¹-EtVal⁴-Cs (5)

25 275 mg de TFFH (1.04 mmoles) sont dissous sous argon dans 3.45 l
de dichlorométhane anhydre. L'undécapeptide déprotégé (4) [438
mg (0.347 mmole)] est alors dissous dans 40 ml de
dichlorométhane anhydre et 0.52 ml (3.82 mmoles) de collidine y
sont ajoutés. Cette solution de peptide légèrement basique est
30 ajoutée goutte-à-goutte à la solution de TFFH durant 20 min sous
argon et agitation vigoureuse. Après 1 h 30 tout le matériel de
départ est cyclisé. Pour emprisonner l'excès de TFFH on ajoute 5
ml d'eau puis la solution est évaporée. On ajoute 200 ml de

dichlorométhane puis le tout est lavé respectivement 3 x avec une solution 0.1 N de HCl aqueux, 3 x avec une solution de saumure puis séché avec du Na_2SO_4 , filtré et le solvant est évaporé. On obtient 360 mg d'une huile jaunâtre. Le produit brut
5 est purifié par chromatographie en gel de silice en utilisant 100 g de gel de silice (0.04-0.0063 mm) et 1 % de méthanol dans de l'acétate d'éthyle comme éluant. On produit ainsi 230 mg (54 %) du dérivé (5) pur.

10 **Clivage du groupe acétate de MeBmt (OAc)-EtVal⁴-Cs (5) et production de EtVal⁴-Cs (6):**

A une solution de 700 mg (0.562 mmole) du dérivé de Cs (5) dans 28 ml de Me OH on ajoute goutte-à-goutte sous argon 1.44 ml
15 d'une solution 0.45 molaire de NaOCH_3 dans du MeOH (0.647 mmole). [La solution de NaOCH_3 dans le méthanol est préparée par addition de sodium au MeOH pur]. La réaction est complète après 48 h sous agitation à température ambiante. Le mélange est amené à pH 5 par addition de 50 % d'acide acétique dans l'eau. Les
20 solvants sont éliminés sous vide. Le produit brut est dissous dans 200 ml d'acétate d'éthyle et extrait 2 x à l'eau. La phase aqueuse est réextraite avec 50 ml d'acétate d'éthyle puis les phases organiques combinées sont lavées 2x par une solution de saumure, séchées par du Na_2SO_4 , filtrées et le solvant est évaporé.

25

Le produit obtenu (750 mg) est chromatographié sur 180 g de gel de silice (0.04-0.063 mm) en utilisant une solution d'acétone/hexane 1:1. (fractions de 20 ml). On produit ainsi 550
30 mg (82 %) de (EtVal⁴) Cs (6).

30

Préparation de H-EtVal-Ot-Bu:

A une suspension de 5 g (23.8 mmoles) de H-ValOtBu x HCl dans 1 l de triméthylorthoformate, on ajoute sous argon 4.1 ml (23.83
5 mmoles) de diisopropyléthylamine. Au bout de 10 minutes la suspension devient claire. A cette solution on ajoute goutte-à-goutte en conditions anhydres 13.5 ml (0.24 mmole) d'acétaldéhyde dissous dans 30 ml de triméthylorthoformate. La réaction est agitée pendant 45 minutes sous argon à température
10 ambiante.

En utilisant un faible vide on élimine l'excès d'acétaldéhyde par évaporation durant 1 h 30. A cette solution, on ajoute sous argon 25 g (0.112 mmole) de NaBH(OAc)₃ solide. Après 15 minutes la
15 solution est refroidie à 0°C et on ajoute lentement 500 ml d'une solution aqueuse d'HCl à 2 %.

Le triméthylorthoformate est évaporé sous vide et le reste de la solution aqueuse est dilué dans 300 ml d'eau. Cette solution est
20 alors extraite 2 x avec 100 ml de diéthyléther. La phase organique est ensuite réextraite 3 x avec une solution de HCl aqueux à 0.1 N. Les phases aqueuses recombinaées sont refroidies à 0°C, puis le pH est amené à 9 au moyen de NaOH(2N). La solution devient alors trouble. La suspension aqueuse est extraite 4 x au moyen de 100
25 ml de diéthyléther. Les phases organiques recombinaées sont ensuite séchées par le Na₂ SO₄ filtrées et le solvant est finalement évaporé.

4.2 g d'une huile jaunâtre résultant de cette étape sont purifiés par
30 chromatographie en utilisant 900 g d'un gel de silice (0.04-0.063 mm) ainsi qu'un mélange d'hexane/acétate d'éthyle 8:2 comme éluant. On obtient finalement 3.13 g (65 %) de H-EtLeu-OtBu pur.

Les résultats de la table I montrent l'affinité des dérivés de Cs à la cyclophiline A dans un test ELISA compétitif décrit par Quesniaux dans Eur. J. Immunology 1987, 17, 1359-1365. Dans ce test lors de l'incubation avec la cyclophiline, on ajoute à la Cs à tester de la Cs liée à la BSA (sérum albumine). On calcule alors la concentration requise pour obtenir 50 % d'inhibition (CI_{50}) de la réaction témoin en absence de compétiteur. Les résultats sont exprimés par l'indice de liaison IL qui est le rapport de la CI_{50} du dérivé et de la CI_{50} de la CsA. Un indice de liaison (IL) de 1.0 indique que le composé testé se lie aussi bien que la CsA. Une valeur inférieure à 1.0 indique que le dérivé se lie mieux que la CsA, de même une valeur supérieure à 1.0 signifie que le dérivé se lie moins bien à la CyP que la CsA

TABLE I

Substance	Structure	IL	IR
UNIL 001	CsA	1.0	1.0
UNIL 002	MeVal ⁴ -Cs	0.6	>200
UNIL 004	EtVal ⁴ -Cs	1.0	>200
UNIL 007	MeIle ⁴ -Cs	0.5	>200
UNIL 013	Et ILe ⁴ -Cs	1.3	>200
UNIL 014	Et Phe(4-CH ₂ PO(OMe) ₂)-Cs	0.5	>200

La Cs est considérée être immunosuppressive lorsque son activité dans la réaction de mélange lymphocytaire (MLR) est supérieure à 5 %. La réaction (MLR) est décrite par T. Meo dans "Immunological methods", L. Lefkovits et B. Devis, Eds, Académie Prev. N.Y. pp: 227-239 (1979).

Des cellules de la rate ($0.5 \cdot 10^6$) provenant de souris Balb/c (femelles, 8 à 10 semaines) sont co-incubées 5 jours en présence de cellules de la rate traitées provenant de souris CBA (femelles, 8 à 10 semaines). Ces cellules ont été traitées par la mitomycine C ou
5 ont été irradiées à 2000 rads. Les cellules allogéniques de rate non irradiées présentent une réponse proliférative chez les cellules Balb/c que l'on peut mesurer par l'incorporation dans l'ADN d'un précurseur marqué. Lorsque les cellules stimulatrices sont irradiées (ou traitées à la mitomycine C) les cellules de Balb/c ne
10 présentent plus une réponse proliférative mais conservent cependant leur antigénicité. La CI_{50} calculée dans le test de MLR est comparée à la CI_{50} correspondant à la CsA dans une expérience parallèle. On trouve ainsi l'indice IR étant le rapport de la CI_{50} du test MLR des dérivés sur la CI_{50} de la cyclosporine A.

15

De la même façon que pour l'indice de liaison (IL) précédent, une valeur de 1.0 pour l'IR signifie une activité similaire à la CsA. De même, une valeur inférieure signifie une meilleure activité et une valeur supérieure à 1.0 démontre une activité du composé
20 inférieure à celle de la CsA.

Une valeur d'IR > 20 montre que la substance est non-immunosuppressive. Les valeurs d'immunosuppression des dérivés sont données dans la table I.

25

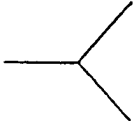

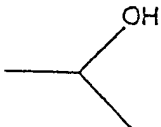
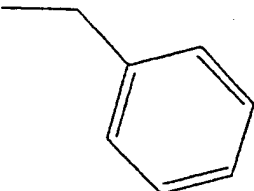
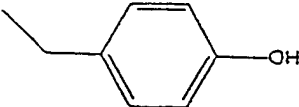
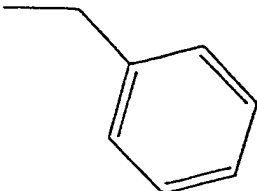
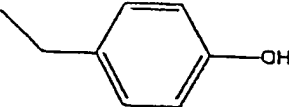
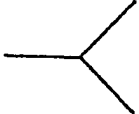
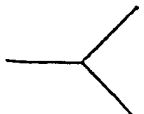
La table II décrit le pourcentage de protection lors d'une infection par le HIV d'une lignée cellulaire CEM-SS. La protection de cette lignée en présence d'un dérivé de Cs est comparée à l'infection d'une lignée cultivée en absence de dérivé de Cs (témoin
30 contrôle). Une valeur moyenne est établie à une concentration du dérivé de $2 \cdot 10^{-6}$ molaire. La mesure de cette activité anti-HIV a été effectuée par le NCI (National Cancer Institute) à Washington aux USA.

TABLE II

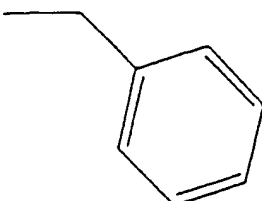
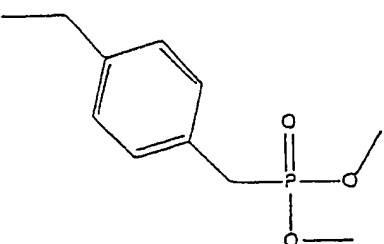
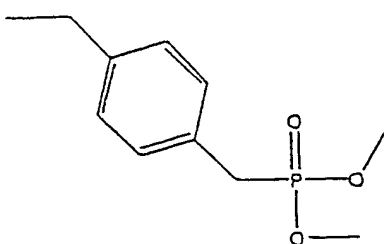
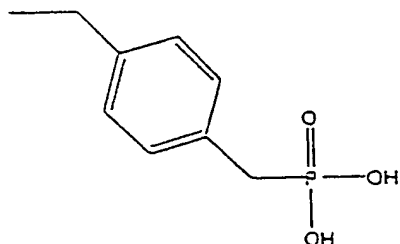
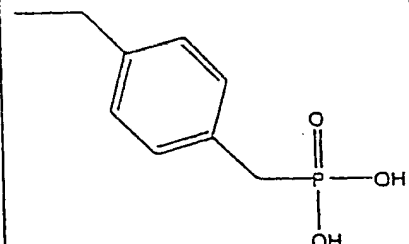
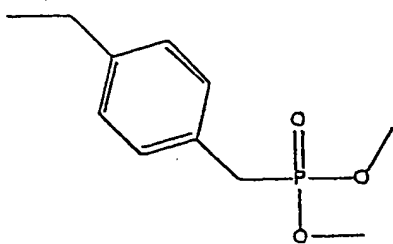
Substance	Structure	Pourcentage de protection à HIV
UNIL 002	MeVal ⁴ -Cs	66.4
UNIL 004	EtVal ⁴ -Cs	74.9
UNIL 007	Melle ⁴ -Cs	68.5

Un meilleur pourcentage de protection à l'infection par le HIV
5 obtenu pour le composé Et Val⁴-Cs (comparé aux deux autres
références connues pour être 10 x meilleures que la CsA)
démontre l'avantage de la substitution par un N-éthyle en
position 4. Cette remarque est encore plus valable lorsque l'on
compare l'affinité à la CyP de chaque substance. On obtient pour le
10 dérivé Et Val⁴-Cs une affinité à la Cyp semblable à celle de la CsA
(IL=1.0) alors que les dérivés MeVal⁴-Cs et Melle⁴-Cs démontrent
une affinité à la Cyp supérieure (IL=0.6 et 0.5 respectivement). A
une affinité à la Cyp plus faible de EtVal⁴-Cs correspondant une
activité anti-HIV plus forte. Ceci démontre bien la valeur de cette
15 nouvelle dérivation.

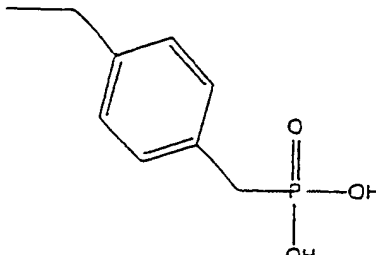
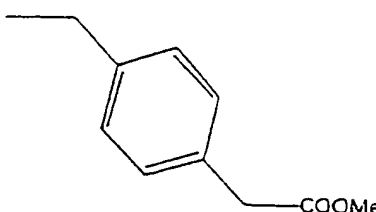
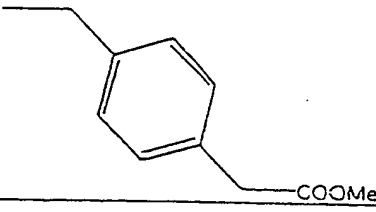
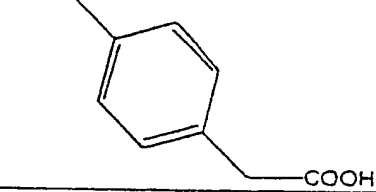
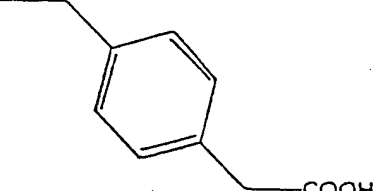
TABLE III

Substance	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	$[\alpha]_D^{20}$
EtVal ⁴ CS	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	CH_2CH_3	-H		c=0.07, MeOH -177
EtIle ⁴ CS	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	CH_2CH_3	-H		c=0.05, MeOH -204
EtThr ⁴ CS	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	CH_2CH_3	-H		
EtPhe ⁴ CS	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	CH_2CH_3	-H		c=0.14, MeOH -159
EtTyr ⁴ CS	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	CH_2CH_3	-H		
MePhe ⁴ CS	$-\text{CH}_3$	CH_2CH_3	-H		c=0.06, MeOH -134
MeTyr ⁴ CS	$-\text{CH}_3$	CH_2CH_3	-H		c=0.07, MeOH -95
D-MeAla ³ EtVal ⁴ CS	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	CH_2CH_3	$-\text{CH}_3$		c=0.12, MeOH -145
D-MeSer ³ EtVal ⁴ CS	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	CH_2CH_3	$-\text{CH}_2\text{OH}$		

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Substance	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	[α] _D ²⁰
D-MeAla ³ -EtPhe ⁴ CS	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₃		c=0.06, MeOH -138
D-MeAla ³ -EtPhe ⁴ (4-CH ₂ -PO(OMe) ₂) ₂	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	-CH ₃		
D-MeSer ³ -EtPhe ⁴ (4-CH ₂ -PO(OMe) ₂) ₂	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	-CH ₂ OH		
D-MeAla ³ -EtPhe ⁴ (4-CH ₂ -PO(OH) ₂) ₂	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	-CH ₃		
D-MeSer ³ -EtPhe ⁴ (4-CH ₂ -PO(OH) ₂) ₂	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	-CH ₂ OH		
EtPhe ⁴ (4-CH ₂ -PO(OMe) ₂) ₂	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	-H		c=0.05, MeOH -136

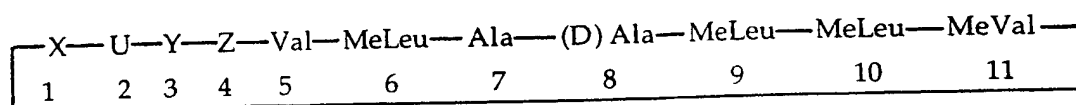
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Substance	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	[α] _D ²⁰
EtPhe ⁴ (4-CH ₂ -PO(OH) ₂) ₂	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	-H		
EtPhe(4-CH ₂ COOMe) ⁴ CS	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	-H		c=0.15, MeOH -160
D-MeAla ³ -EtPhe(4-CH ₂ COOMe) ⁴ CS	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	-CH ₃		
EtPhe(4-CH ₂ COOH) ⁴ CS	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	-H		
D-MeAla ³ -EtPhe(4-CH ₂ COOH) ⁴ CS	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	-CH ₃		

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Revendications

- 5 1) Cyclosporine de synthèse caractérisée par la formule:



dans laquelle:

X est -MeBmt ou 6,7 dihydro-MeBmt-

- 10 U est -Abu, Nva, Val, Thr

Y est Sar ou (D)-MeSer ou (D)-MeAla ou (D)-MeSer (OAcyl)

Z est (N-R)aa où aa={Val, Ile, Thr, Phe, Tyr, Thr (OAc), Thr (OG₁),
Phe (G₂), PheCH₂(G₃), Tyr (OG₃)} avec R={alkyl > CH₃};

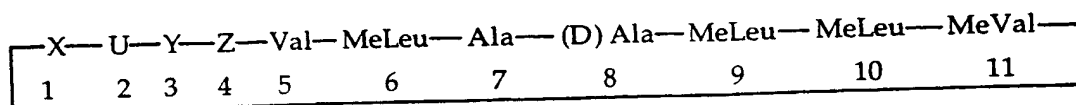
- 15 G₁= {Phényle-COOH, Phényle-COOMe, Phényle-COOEt};
G₂= {CH₂COOH, CH₂COOMe(Et), CH₂PO(OMe)₂, CH₂PO(OH)₂};
G₃= {PO(OH)₂, PO(OCH₂CH=CH₂)₂, CH₂COOH, CH₂COOMe (Et)}.

- 2) Cyclosporine selon la revendication 1, caractérisée en ce que le
résidu Z en position 4 est (R)Val avec R > CH₃ et R < -C₁₀H₂₁.

20

- 3) Cyclosporine selon l'une quelconque des revendications
précédentes caractérisée en ce que le résidu Z en position 4 est
N-éthyle-Valine.

- 25 4) Composition pharmaceutique contenant le composé
caractérisé par la formule:



30

dans laquelle:

X est -MeBmt ou 6,7 dihydro-MeBmt-

U est -Abu, Nva, Val, Thr

Y est Sar ou (D)-MeSer ou (D)-MeAla ou (D)-MeSer (OAcyl)

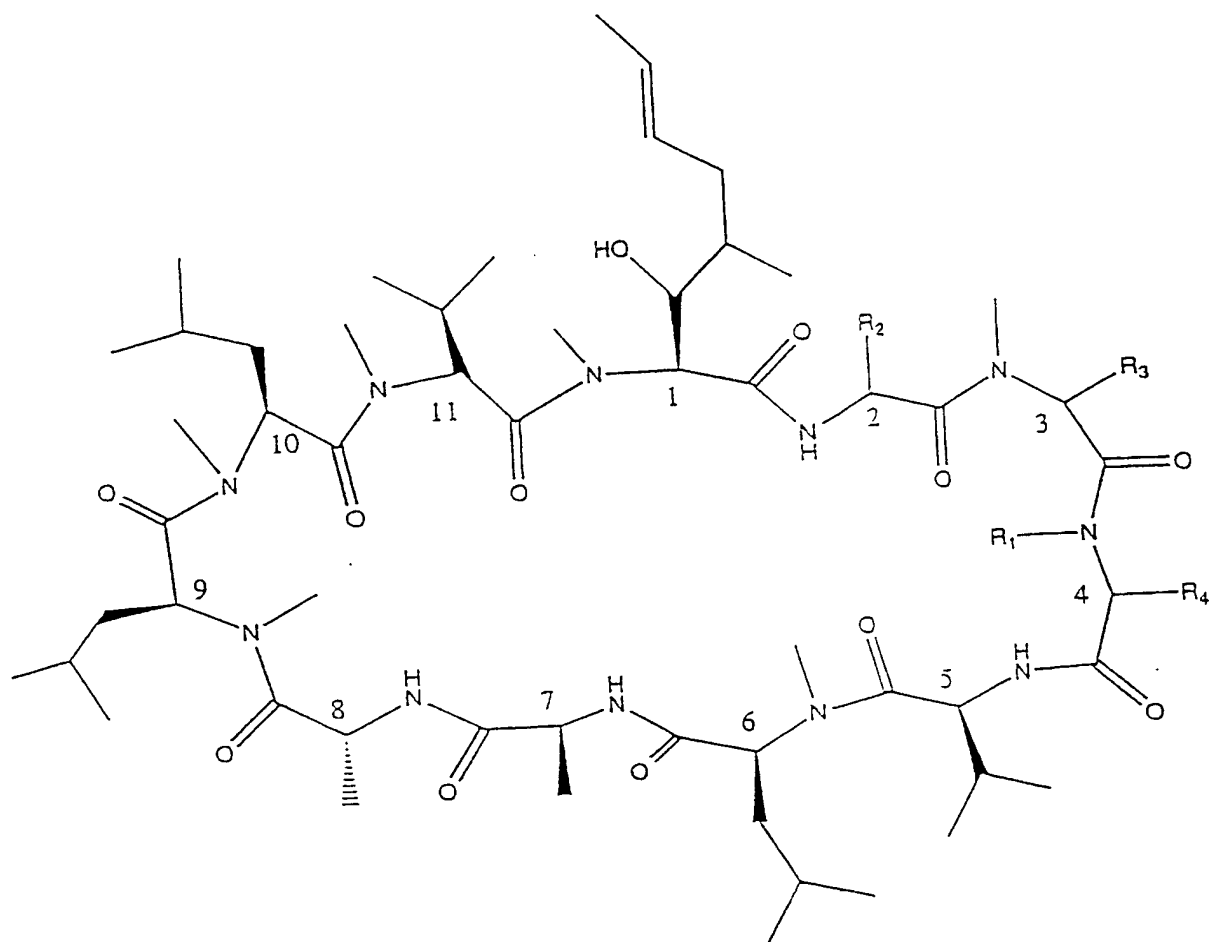
- 5 Z est (N-R)aa où aa={Val, Ile, Thr, Phe, Tyr, Thr (OAc), Thr (OG₁),
Phe (G₂), PheCH₂(G₃), Tyr (OG₃)} avec R={alkyl > CH₃};
G₁= {Phényle-COOH, Phényle-COOMe, Phényle-COOEt};
G₂= {CH₂COOH, CH₂COOMe(Et), CH₂PO(OMe)₂, CH₂PO(OH)₂};
G₃= {PO(OH)₂, PO(OCH₂CH=CH₂)₂, CH₂COOH, CH₂COOMe (Et)}.

10

- 5) Composition pharmaceutique selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est associée à une solution acceptable au point de vue pharmaceutique.
- 15 6) Utilisation de la cyclosporine selon l'une quelconque des revendications précédentes pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement et à la prévention du SIDA.
- 20 7) Utilisation de la cyclosporine selon la revendication 3 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement et à la prévention du SIDA.

1/3

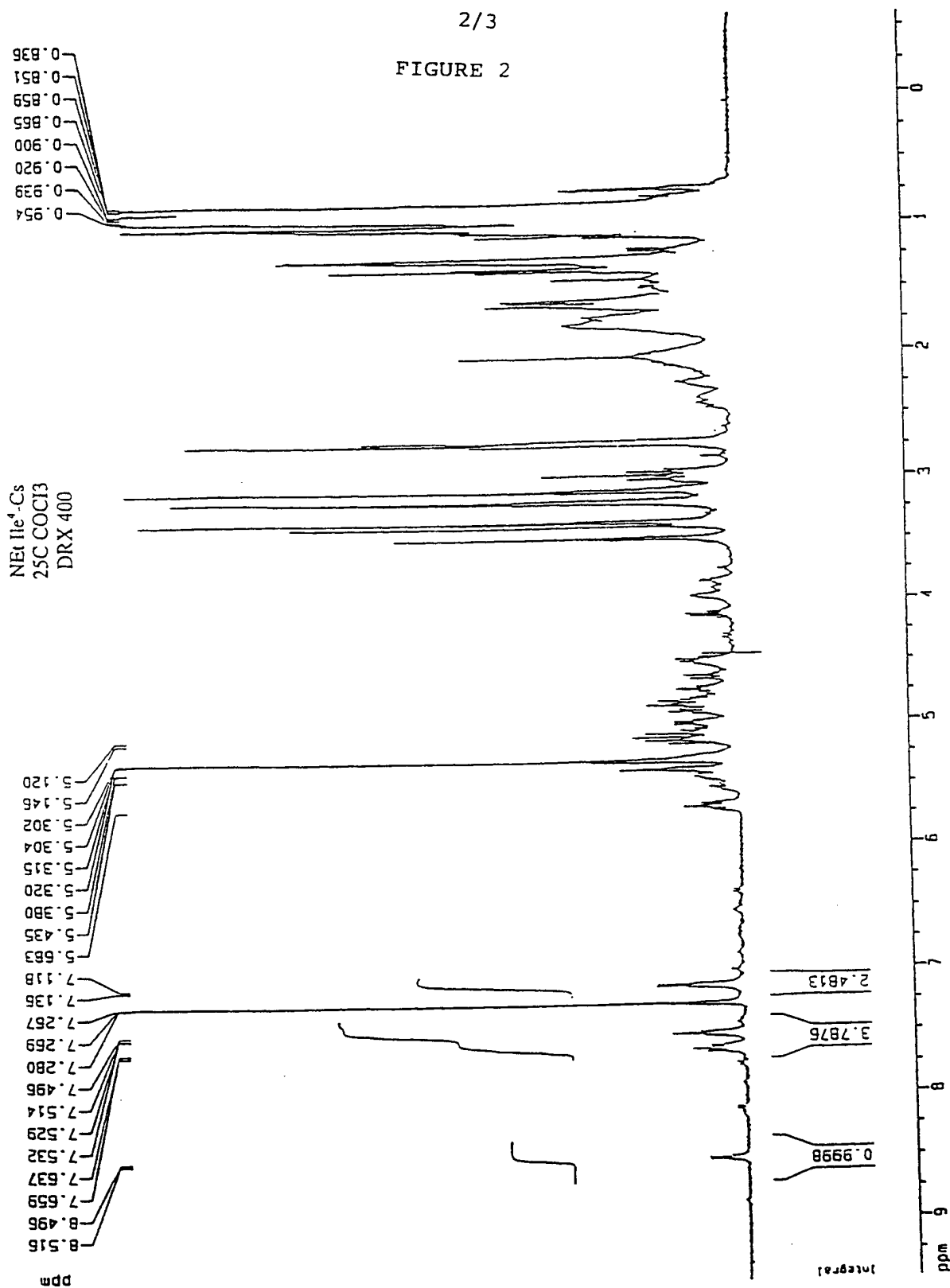
FIGURE 1



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

2/3

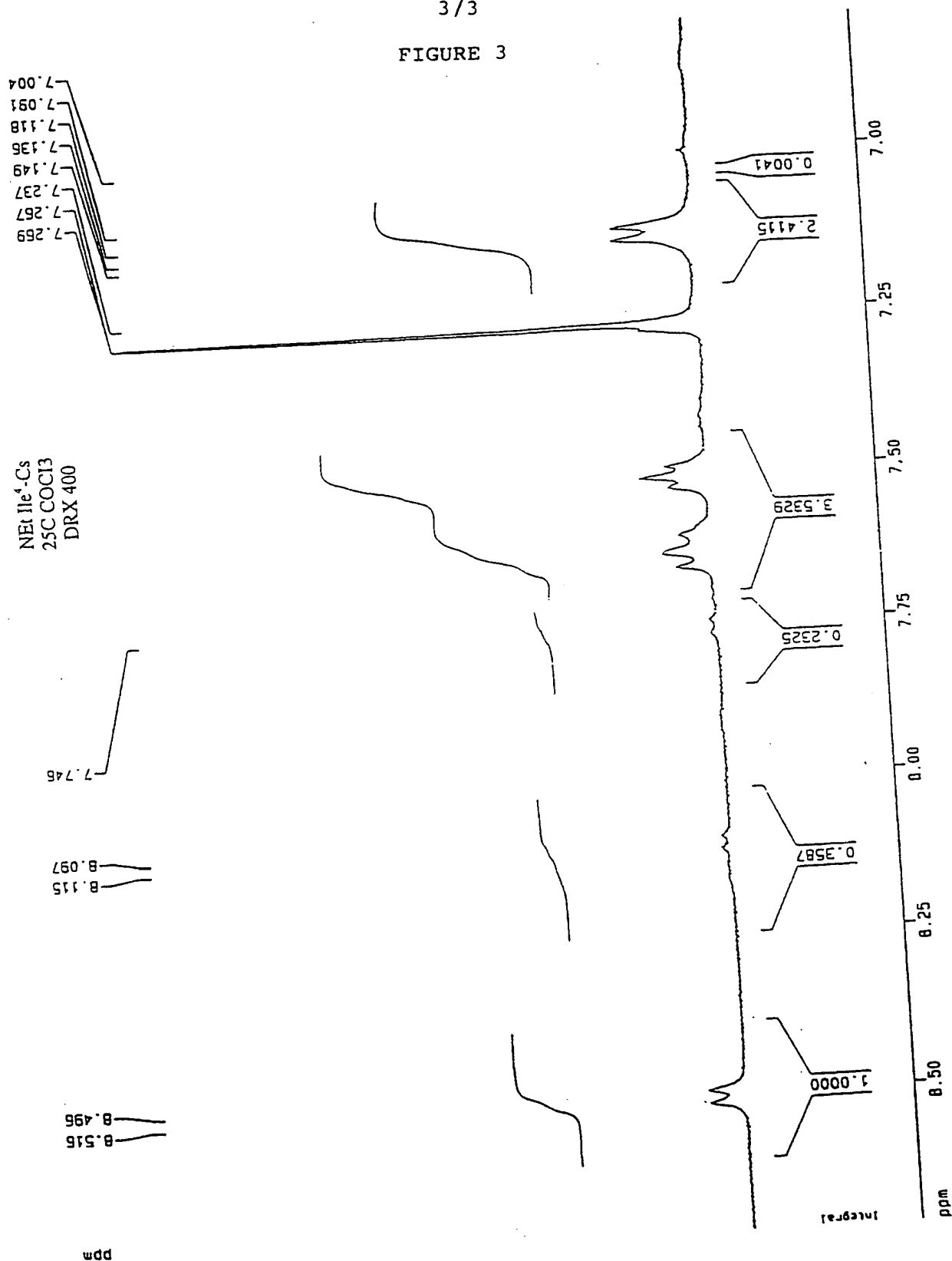
FIGURE 2



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

3/3

FIGURE 3



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/IB 99/01232

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K7/64 A61K38/13

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 484 281 A (SANDOZ AG ; SANDOZ LTD (CH); SANDOZ AG (DE)) 6 May 1992 (1992-05-06) page 4, line 45 - line 56 ----	
A	PAPAGEORGIOU C ET AL: "ANTI HIV-1 ACTIVITY OF A HYDROPHILIC CYCLOSPORIN DERIVATIVE WITH IMPROVED BINDING AFFINITY TO CYCLOPHILIN A" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 6, no. 1, 1996, pages 23-26, 497, XP000615812 ----	
A	WO 97 04005 A (CHEM AG C ; LUECHINGER JEAN M (CH)) 6 February 1997 (1997-02-06) -----	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 September 1999

Date of mailing of the international search report

04/10/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cervigni, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB 99/01232

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0484281 A	06-05-1992	AT 148469 T	15-02-1997
		AU 649277 B	19-05-1994
		AU 8692391 A	07-05-1992
		CA 2054590 A	03-05-1992
		CS 9103297 A	13-05-1992
		DE 69124459 D	13-03-1997
		DE 69124459 T	10-07-1997
		DK 484281 T	17-02-1997
		ES 2095926 T	01-03-1997
		FI 915135 A	03-05-1992
		GR 3022592 T	31-05-1997
		HK 1005741 A	22-01-1999
		HU 212674 B	30-09-1996
		IL 99912 A	12-09-1996
		JP 2740775 B	15-04-1998
		JP 5208996 A	20-08-1993
		MX 9101869 A	01-04-1993
		PT 99410 A,B	30-09-1992
		SK 278808 B	04-03-1998
		US 5767069 A	16-06-1998
		ZA 9108718 A	03-05-1993
		PL 168609 B	29-03-1996
		RU 2085589 C	27-07-1997
WO 9704005 A	06-02-1997	AU 6700196 A	18-02-1997
		BR 9609795 A	16-03-1999
		CA 2226880 A	06-02-1997
		CN 1192750 A	09-09-1998
		CZ 9800051 A	15-04-1998
		EP 0842191 A	20-05-1998
		HU 9900405 A	28-06-1999
		NO 980195 A	15-01-1998
		PL 324531 A	08-06-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der 'e Internationale No

PCT/IB 99/01232

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C07K7/64 A61K38/13

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 484 281 A (SANDOZ AG ; SANDOZ LTD (CH); SANDOZ AG (DE)) 6 mai 1992 (1992-05-06) page 4, ligne 45 - ligne 56	
A	PAPAGEORGIOU C ET AL: "ANTI HIV-1 ACTIVITY OF A HYDROPHILIC CYCLOSPORIN DERIVATIVE WITH IMPROVED BINDING AFFINITY TO CYCLOPHILIN A" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 6, no. 1, 1996, pages 23-26, 497, XP000615812	
A	WO 97 04005 A (CHEM AG C ; LUECHINGER JEAN M (CH)) 6 février 1997 (1997-02-06)	

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 septembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/10/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Cervigni, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den e Internationale No

PCT/IB 99/01232

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0484281 A	06-05-1992	AT 148469 T	15-02-1997
		AU 649277 B	19-05-1994
		AU 8692391 A	07-05-1992
		CA 2054590 A	03-05-1992
		CS 9103297 A	13-05-1992
		DE 69124459 D	13-03-1997
		DE 69124459 T	10-07-1997
		DK 484281 T	17-02-1997
		ES 2095926 T	01-03-1997
		FI 915135 A	03-05-1992
		GR 3022592 T	31-05-1997
		HK 1005741 A	22-01-1999
		HU 212674 B	30-09-1996
		IL 99912 A	12-09-1996
		JP 2740775 B	15-04-1998
		JP 5208996 A	20-08-1993
		MX 9101869 A	01-04-1993
		PT 99410 A, B	30-09-1992
		SK 278808 B	04-03-1998
		US 5767069 A	16-06-1998
		ZA 9108718 A	03-05-1993
		PL 168609 B	29-03-1996
		RU 2085589 C	27-07-1997
WO 9704005 A	06-02-1997	AU 6700196 A	18-02-1997
		BR 9609795 A	16-03-1999
		CA 2226880 A	06-02-1997
		CN 1192750 A	09-09-1998
		CZ 9800051 A	15-04-1998
		EP 0842191 A	20-05-1998
		HU 9900405 A	28-06-1999
		NO 980195 A	15-01-1998
		PL 324531 A	08-06-1998

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)

